

いわまつ ゆたか

氏名（本籍地）	岩松 優
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第119号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生態システム生命科学専攻
論文題目	紫外線 UVB によるイネの生育傷害と CPD 光回復酵素に関する研究
博士論文審査委員	（主査）准教授 日出間 純 教授 渡辺 正夫 教授 南澤 究 教授 高橋 秀幸

序論

紫外線 UVB は、植物の光合成活性の低下、生育傷害を引き起こす。これまでに、世界主要穀物であるイネを対象に、UVB 量の増加がイネの生育、収量に及ぼす影響、イネの UVB 耐性機構に関する研究が行われてきた。その結果、①UVB の効果に対して各イネ品種は異なった感受性を示し、同じ生態型、グループに属す品種間でも UVB に対する感受性は大きく異なること、②日本水稻グループに属するササニシキは強い抵抗性を示すが、近縁関係にある農林 1 号は感受性を示すこと、③遺伝解析および量的遺伝子座解析により、イネの UVB 感受性に関与する遺伝子座は少なくとも 3 箇所存在すること、④UVB 感受性品種農林 1 号において、UVB によって誘発される DNA 損傷の 1 つである Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) を修復する光回復酵素活性が、抵抗性品種ササニシキと比較して低いこと、⑤生化学的解析より、農林 1 号の CPD 光回復酵素は、基質 CPD との結合速度がササニシキと比べ遅く、また、酵素-基質複合体の温度安定性が低いことを見出してきた。これらの結果から、ササニシキ、農林 1 号の UVB 感受性差異は、CPD 光回復酵素の構造変異による活性の違いに起因している可能性が示唆された。

本研究では、まず①ササニシキと農林 1 号の CPD 光回復能の違いが両品種の UVB 感受性を決定する主要因であり、2 品種間の CPD 光回復能の差は酵素の構造変異に起因するのか、②多数存在する栽培イネ品種間で大きく異なる UVB 感受性差異も、CPD 光回復酵素活性の高低（光回復酵素の構造的変異）に由来するのかを明らかにすることを目的とした。またさらに、イネの生育傷害と CPD との関係に関する解析を行い、CPD による生育阻害機構に関して考察することとした。

1 章

ササニシキ、農林 1 号の近縁種およびその親系統である愛国、朝日、亀の尾、銀坊主を含めた 17 品種 (*Oryza sativa* L. cvs, ssp; japonica) を用いて UVB 感受性と CPD 光回復酵素の活性と遺伝子型を解析した。その結果、①各品種の CPD 光回復酵素活性はササニシキと同程度の高いものと、農林 1 号と同程度の低いものの 2 つのグループに分けられた。②高い CPD 光回復酵素活性を有していた品種は、UVB による生育傷害の程度が小さく、また、低い CPD 光回復酵素活性を有していた品種は UVB による生育傷害の程度が大きく

なる傾向が見られた (図 1)。③CPD 光回復酵素の遺伝子配列を決定し、各品種間での推定アミノ酸配列を比較したところ、126 番目のアミノ酸がササニシキではグルタミン (“Sasa”-type) であったのに対して、農林 1 号ではアルギニン (“Nori”-type) であった。さらに、各品種は、“Sasa”-type、“Nori”-type のどちらかに属し、“Sasa”-type CPD 光回復酵素遺伝子を有す品種はいずれも高い酵素活性を示したのに対し、“Nori”-type CPD 光回復酵素遺伝子を有す品種はいずれも低い酵素活性を示した。

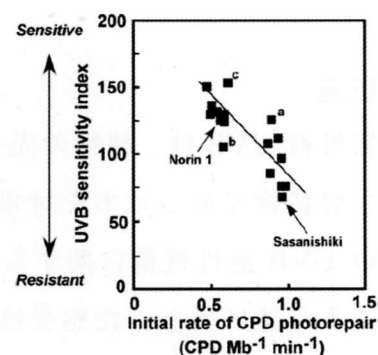


図1 CPD光回復酵素活性の初速度とUVB-sensitivity indexの相関

また、農林 1 号と比べ UVB による生育傷害の程度が著しく大きいインド型栽培品種サージャンキ (*Oryza sativa* L. cvs, ssp: indica) の CPD 光回復酵素活性と遺伝子型の解析を行なった。その結果、サージャンキの CPD 光回復酵素活性は、農林 1 号と比べ明らかに低下しており、酵素のアミノ酸配列は、ササニシキの配列と比較して、農林 1 号と同様に 126 番目がアルギニンであったのに加え、296 番目が、グルタミンからヒスチジンに変異していた。以上の結果から、イネの UVB 感受性差異は CPD 光回復能力の影響を大きく受け、その差はアミノ酸置換による酵素の構造変異に起因している可能性が極めて高いことが明らかになった。

2 章

栽培イネの遺伝的背景は狭小であるにも関わらず、1 章で述べたように CPD 光回復酵素遺伝子内には、活性に大きな影響を及ぼす変異が 2 箇所も存在していた。様々な遺伝子資源をもつと考えられている野生イネなどにおいては、多種多様の変異が存在している可能性がある。

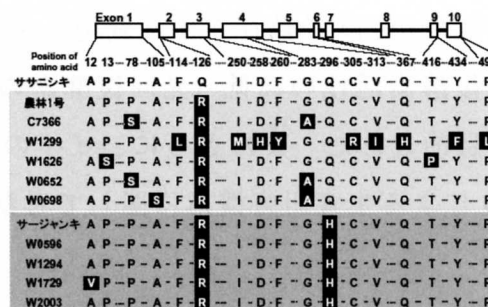


図2 各イネ系統のCPD光回復酵素のアミノ酸配列

そこで第 2 章では、野生イネを用いて、CPD 光回復酵素の活性と遺伝子型に注目し、新規の CPD 光回復酵素の遺伝子型及びイネの UVB 感受性に関わる新規遺伝子資源の探索を行なった。材料として、アフリカに自生する W0652、W0698 (*Oryza barthii*)、オーストラリアに自生する W1299、W1626 (*Oryza meridionalis*)、アジア地域に自生する W0596、W1294、W1729、W2003 (*Oryza rufipogon*)の野生イネ 8 系統とアフリカ栽培イネ C7366 (*Oryza glaberrima*)、コントロールとして日本型栽培イネの UVB 抵

抗性品種ササニシキ、UVB 感受性品種農林 1 号、インド型栽培イネの UVB 超感受性品種サージャンキが用いられた。その結果、①野生イネの UVB 感受性、CPD 光回復酵素の活性、遺伝子型は多様であったが、草型、自生地、species に関係なく、UVB 感受性は CPD 光回復酵素活性に依存していた、②各系統の CPD 光回復酵素活性は、126 番目と 296 番目のアミノ酸置換の影響を強く受けてい

た、③W1299 の CPD 光回復酵素遺伝子は、農林 1 号と比較して、9 箇所のアミノ酸に変異が生じており(図 2)、“Nori”-type であるが、“Sasa”-type(-Gln¹²⁶-Gln²⁹⁶-)と同程度の酵素活性を示した(図 3)。これらの結果から、CPD 光回復酵素遺伝子の 126 番目と 296 番目のアミノ酸は、酵素の機能において重要であり、W1299 特異的な 9 箇所のアミノ酸変異のどれかが、酵素活性を高めていることが明らかになった。

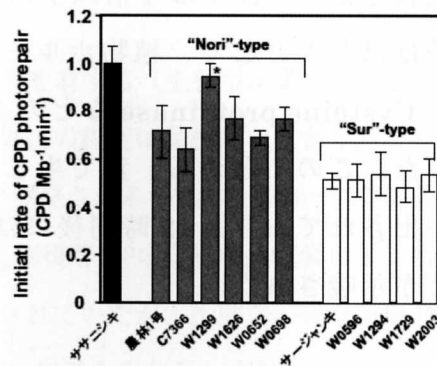


図3 各イネ系統のCPD光回復酵素活性の初速度と遺伝子型の関係

3 章

第 1、2 章の結果からイネの品種間における UVB 感受性差異の主要因は、CPD 光回復酵素活性の差異に起因していることが分かった。この結果は言い換えると UVB によって生じた CPD がイネの生育傷害の要因となっていることを意味する。したがって、DNA 上に生じた CPD が複製、転写を阻害し、結果として細胞分裂の阻害やタンパク質量の低下を引き起こして生育が阻害されると考えられる。しかしながら、細胞分裂が起きる茎頂分裂組織は茎部と根部の境界付近に存在し、構造上、直接 UVB が照射されているとは考えがたい。事実、UVB 付加条件下で生育しているイネの茎頂分裂組織では、CPD はほとんど存在していなかった。では一体、どのようなメカニズムにより CPD は生育阻害を導いているのか？そこで、UVB 付加条件下で生育させた場合、葉に定常的に 2~3 CPD Mb⁻¹ 存在するササニシキとササニシキにアンチセンス方向に CPD 光回復酵素を形質転換し、UVB 照射時間に伴って CPD 量が増加する AS-D を用いることで、葉に生じた CPD による茎頂分裂組織の遺伝子発現への影響を調べた。その結果、①UVB 照射後 8 時間では、up regulate された遺伝子はササニシキ、AS-D において一部同じであったが、AS における発現の方が高く、88 個の遺伝子にはストレス応答因子、転写因子、シグナル因子が含まれていた。②UVB 照射後 12 時間では、ササニシ

キと比較して AS-D では 4 倍以上の遺伝子数の発現が誘導され、8 時間では確認された遺伝子はほとんどなく、植物ホルモンに応答する転写因子および Peptidase S8 and S53、Cysteine proteinase などのタンパク分解に関する因子の発現が up regulate されていた。このことから、葉で生じた CPD に応答し、8 時間の段階では何らかのシグナルが出されており、12 時間後には、細胞の形成やタンパク分解に影響を及ぼしていることが示唆された。

まとめ

世界各地で栽培されているイネ品種、さらには草型、遺伝的背景が大きく異なる野生イネ種間においても、UVB 感受性は大きく異なる。このように UVB に対する種間差は、CPD 光回復酵素の突然変異による酵素活性の違いに起因していた。イネ種間において CPD 光回復酵素遺伝子内には多種の変異が存在していたが、中でも 126 番目と 296 番目のアミノ酸の変異がその酵素活性に大きな影響を及ぼし、UVB による生育傷害にも影響を及ぼしていることが明らかになった。また、本研究を通して、126 番目のアミノ酸がグルタミンからアルギニンに置換されることで低下する酵素活性を補うアミノ酸置換を有する野生イネ W1299 に存在することを明らかにした。このようなアミノ酸配列と酵素活性、さらには UVB 感受性との関係に関する知見は、今後の酵素構造の解析および UVB 耐性品種の作出に有益であると考えられる。

UVB によるイネの生育傷害は、葉内に生じた CPD が茎頂分裂組織における遺伝子発現に間接的に働き（おそらくシグナルとして）、影響を及ぼすことが明らかになった。

論文審査結果の要旨

イネは、アジア地域を中心に世界各地で、様々遺伝的背景を有する（生態型が異なる）イネ品種が育成されているが、有害紫外線（UVB）に対する生育傷害の程度は品種間で大きく異なっている。このような UVB 感受性差異の要因は、UVB によって誘発される DNA 損傷の一つであるシクロブタン型ピリミジン二量体（CPD）を修復する“CPD 光回復酵素”の自然突然変異による活性の違いによることが一部のイネ品種を用いた解析から指摘されていたが、生態型が異なる他のイネの UVB 感受性差異の要因が、CPD 光回復酵素活性の違いに起因するか否かは不明であった。本論文では、CPD 光回復酵素の活性とその遺伝子型に着目して、イネの UVB による生育傷害機構を明らかにすることを目的にした。

本研究では、まず世界各地で栽培され生態型が異なるイネ品種、さらには遺伝子資源の宝庫と言われる野生イネ約 30 種を材料に、UVB 感受性と CPD 光回復酵素の活性、遺伝子型との関係を比較解析した。その結果、UVB 感受性は品種・種間で大きく異なるものの、生態型が異なっても UVB 生育傷害の程度は、CPD 光回復酵素活性の高低と高い相関が認められた。そして、注目すべき点は、CPD 光回復酵素の遺伝子型は多種多様に存在していたが、酵素活性の違いは、126 番目と 296 番目のアミノ酸の変異に強く依存していることを見出した。またさらに、酵素活性の低下を軽減し、高い酵素活性を導くアミノ酸変異も見出した。これらの結果は、UVB によるイネの生育傷害の主要因が、UVB 誘発 DNA 損傷 CPD であり、CPD 光回復酵素の遺伝子型をマーカーにした交雑育種によって、UVB 量が増加した未来環境下においても UVB に抵抗性を有したイネの作出が可能であることを指摘したと言える。またさらに、本研究では、イネの各器官に生じた CPD が、DNA の複製や転写が盛んで生育を決定する茎頂分裂組織内の遺伝子発現に及ぼす網羅的解析を行い、イネの UVB による生育傷害は、茎頂分裂組織以外の組織である葉で生じた CPD が、間接的に茎頂分裂組織における遺伝子発現に影響を及ぼし、結果として生育傷害を導いていることを示唆する結果を示した。

本研究によって新たに見出された知見は、今日の地球環境問題、人口増加に伴う食糧危機問題といった社会問題に対して、世界主要穀物であるイネ育種の方向性を明確に提示すると同時に、植物の UVB 環境応答機構に新たな概念を導入した。従って、本研究成果は、論文提出者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを明瞭に示しており、岩松優氏提出の論文を博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。